



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Aluno: Lucas Eduardo Correia da Silva
Orientador: Dr. Marcelo José Barbosa Silva

AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS IL-6 E TNF-ALFA NO SORO DE PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA

Uberlândia
Dezembro/2019

LUCAS EDUARDO CORREIA DA SILVA

AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS IL-6 E TNF-ALFA NO SORO DE PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA

Pesquisa monográfica apresentada como trabalho de conclusão de curso, requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, na Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva.

Uberlândia/MG

Dezembro/2019

LUCAS EDUARDO CORREIA DA SILVA

AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS IL-6 E TNF-ALFA NO SORO DE PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA

Pesquisa monográfica apresentada como trabalho de conclusão de curso, requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, na Universidade Federal de Uberlândia.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof^ª. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

Prof^ª. Dra. Bruna Cristina Borges

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva.

Uberlândia, 10 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade da vida, pela oportunidade de ser melhor a cada dia e por sempre me abençoar na minha jornada.

Agradeço aos meus pais, por toda a minha formação, por sempre me apoiarem e me incentivarem a buscar meus objetivos, por estarem do meu lado sempre quando precisei, por me darem todo o suporte para que eu pudesse estudar.

A minha família, que sempre estiveram me incentivando ao estudo e principalmente a minha avó que sempre me deu todo o suporte que eu precisava, juntamente com meus pais, para que eu ingressasse no ensino superior em outra cidade.

Aos amigos que fiz na faculdade, que passamos por todas as dificuldades juntos, que dividimos todos os momentos, que aprendemos juntos e que vamos levar essa amizade além do curso.

Aos meus amigos de Monte Carmelo, por todo o companheirismo e que mesmo estando longe não desfizemos nosso laço de amizade.

Ao meu orientor, por todas as oportunidades oferecidas, por todo o conhecimento adquirido e por sempre me incentivar a melhorar.

A todos do laboratório de Biomarcadores tumorais e osteoimunologia, por me ajudarem sempre quando precisei, pelos conhecimentos adquiridos e pela convivência.

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é uma das principais causas de morte no mundo, sendo mais frequente nas mulheres. Ele pode ser classificado pelos receptores hormonais, estadiamento, grau, subtipo molecular, metástase e dentre outras variáveis. De um modo geral, as citocinas envolvem um vasto grupo de moléculas que são capazes de evocar efeitos nas células em uma resposta imune e muitas delas estão envolvidas no desenvolvimento do tumor, sendo anti ou pró-tumoral. O TNF- α e a IL-6 têm seu papel dicotômico mostrado em diversos estudos, pois as duas são citocinas pró-inflamatórias e tem como função primordial manter a homeostase do organismo, porém, elas podem assumir um papel pró-tumoral dependendo de uma série de fatores como: tipo do tumor, microambiente tumoral, interferência de outras citocinas, desregulação na sua produção, entre outros. Portanto, estabelecer uma relação entre essas citocinas e alguns fatores clínicos dos pacientes pode fornecer informações importantes para analisar o potencial de biomarcador tumoral dessas citocinas. **Objetivo:** Esse trabalho teve como objetivo quantificar IL-6 e TNF- α no soro de pacientes com câncer de mama e analisar sua relação com algumas variáveis clínicas. **Metodologia:** Foi utilizado a citometria de fluxo com o LegendPlex, um kit que se baseia nos princípios de imunoensaio sanduíche para detectar e quantificar essas citocinas no soro de 80 pacientes com câncer de mama. **Resultados:** Os resultados obtidos mostram que não há relação entre as citocinas TNF- α e IL-6 com as variáveis clínicas. **Conclusão:** Concluiu-se que não existe uma relação significativa entre as citocinas analisadas e as variáveis clínicas.

Palavras-chave: câncer de mama; citocinas; IL-6; TNF- α ; legendPlex; receptores hormonais; subtipo molecular; estadiamento tumoral; grau tumoral.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is one of the leading causes of death worldwide, being more frequent in women. It can be classified by hormone receptors, staging, grade, molecular subtype, metastasis and among other variables. Generally speaking, cytokines involve a large group of molecules that are capable of evoking effects on cells in an immune response and many of them are involved in tumor development, whether anti or pro-tumor. TNF- α and IL-6 have their dichotomous role shown in several studies, since both are proinflammatory cytokines and their primary function is to maintain the body's homeostasis, but they may assume a pro-tumoral role depending factors such as: tumor type, tumor microenvironment, interference of other cytokines, deregulation in its production, among others. Therefore, establishing a relationship between these cytokines and some clinical factors of patients may provide important information to analyze the tumor biomarker potential of these cytokines. **Objective:** This study aimed to quantify IL-6 and TNF- α in the serum of breast cancer patients and to analyze their relationship with some clinical variables. **Methodology:** Flow cytometry was used with LegendPlex, a kit based on sandwich immunoassay principles to detect and quantify these cytokines in the serum of 80 breast cancer patients. **Results:** The results obtained show that there is no relationship between TNF- α and IL-6 cytokines with clinical variables. **Conclusion:** It was concluded that there is no significant relationship between the analyzed cytokines and the clinical variables.

Keywords: breast cancer; cytokines; IL-6; TNF- α ; legendPlex; hormone receptors; molecular subtype; tumor staging; tumor grade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Amostras	13
3.2 Kit LEGENDplex	13
3.3 Delineamento Experimental.....	14
3.4 Processamento das amostras	14
3.5 Análise Estatística.....	15
4. RESULTADOS	16
4.1 Receptores Hormonais	16
4.2 Estadiamento e Metástase	17
4.3 Grau e Subtipo.....	17
4.4 Correlação entre Receptores hormonais e estadiamento.....	18
4.5 Correlações entre IL-6, TNF- α e variáveis clínicas.....	19
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO.....	22
7. REFERÊNCIAS	22
ANEXOS.....	27
ANEXO A	27
ANEXO B	28
ANEXO C	30

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de várias doenças que têm em comum entre si a proliferação celular desordenada que em muitos casos levam o indivíduo a óbito. Um dos tipos de câncer que afeta a população é o de mama, sendo a população feminina mais afetada pela enfermidade do que a população masculina, devido ao fato de que aproximadamente 75% dos cânceres de mama são receptores de estrogênio positivo (Zheng et al. 2016).

No tecido mamário existem receptores responsáveis pelo desenvolvimento das células, onde as moléculas efetoras se ligam podendo ativá-los e promover a proliferação celular. Os principais receptores nesse tecido são: receptor de estrógeno (ER), progesterona (PR) e fator de crescimento epidérmico humano (HER-2)(Andreopoulou et al. 2015). O prognóstico dos pacientes com a doença está estritamente relacionado com a presença ou não desses receptores, com a metástase, o tamanho e tipo tecidual do tumor, o que o classifica em subtipos diferentes, ocasionando em tratamentos diferentes.

A metástase se define quando as células tumorais atingem a corrente sanguínea e assim conseguem se infiltrar em qualquer parte do organismo. Cerca de 10% dos pacientes diagnosticados com o tumor estão com metástases (Dawood et al. 2010) e geralmente, os ossos são o local onde ocorrem metástases mais frequentemente(Coleman and Rubens 1987), a partir disso, o tratamento deve ser focado nas células metastáticas(Steeg 2016).

Com a diversidade genética e epigenética que há no câncer de mama, ele pode ser dividido em quatro subtipos moleculares principais: luminal A, luminal B, HER2 positivo e triplo negativo (Bai et al. 2014). Câncer de mama triplo-negativo é assim nomeado porque não tem receptores de estrogênio (ER), receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 e receptor de progesterona, portanto, é considerado um dos tipos mais agressivos da doença, mas alguns estudos mostram a expressão do receptor de estrogênio beta neste tipo (Iwao et al. 2000). Cerca de 15% dos cânceres de mama são triplos negativos, mas causam 50% das mortes dos pacientes(Foulkes et al. 2010).

Os subtipos luminais tem sido associados a um melhor prognóstico, porém a superexpressão de HER2 e os tumores triplo-negativos são os mais agressivos e têm um pior prognóstico(Carey et al. 2006). O luminal A é caracterizado por ser receptor de estrógeno e/ou progesterona positivo e receptor HER2 negativo e tem um melhor prognóstico, já o luminal B é estrogênio e/ou progesterona positivo e HER2 positivo, o que o torna mais agressivo e com

um pior prognóstico comparado ao luminal A. A superexpressão de HER2 também está relacionado a um mal prognóstico e uma elevada taxa de mortalidade juntamente com os tumores triplo negativos(Sorlie et al. 2001, Bauer et al. 2007).

	ER	PG	HER2
LUMINAL A	+	+	-
LUMINAL B	+	+/-	-
HER2	-	-	+
TRIPLO-NEGATIVO	-	-	-

O tumor de mama também conta com o grau e estadiamento para auxiliar na sua classificação. O grau vai de 1 a 4, sendo avaliados o tamanho do tumor, invasão linfonodal e presença de metástases, então, o 1 o estágio inicial, com o tratamento mais fácil e com grandes chances de eliminação da doença, já no grau 4 há presença de metástases e com o tratamento mais complicado para o paciente (Taherian-Fard et al. 2015).

GRAU	METÁSTASE	ESTADIAMENTO
1	-	Inicial
2	-	Inicial
3	+	Avançado
4	+	Avançado

De um modo geral, as citocinas envolvem um vasto grupo de moléculas que são capazes de evocar efeitos nas células em uma resposta imune. Através delas sinais são enviados as células que respondem produzindo fatores pró ou anti-inflamatórios que são importantes para a defesa e manutenção do organismo.

A citocina TNF-alfa ou fator de necrose tumoral alfa é pró-inflamatória, secretada por monócitos e tem um papel anti-tumoral(Kriegler et al. 1988), porém em alguns casos ele favorece as células do tumor. Inicialmente, quando foi descoberta, verificou-se a sua capacidade de induzir necrose nos tumores experimentais, mas a partir de estágios mais avançados os tumores começaram a produzir a citocina, instigando o estudo da molécula para estabelecer uma relação clara dela com os cânceres(Balkwill 2009). Ela é uma proteína transmembranar e executa seu papel na sinalização tanto na membrana da célula quanto solúvel. Seus receptores são TNFR1 que está localizado na maioria das células e é ativado pela citocina na forma solúvel e TNFR2 que se encontra em células hematopoiéticas e é ativado pelo ligante acoplado a membrana (Idriss and Naismith 2000). Quando o TNFR1 é ativado ocorre a ativação de genes responsáveis pela inflamação e sobrevivência da célula, mas essa ativação de mediadores inflamatórios pode não ser benéfica quando desregulada, pois a mesma induz a produção de fatores de crescimento pela via de AP-1 que ativam NF- κ B e essa ativação induz alguns fatores que regulam negativamente a apoptose (Varfolomeev and Ashkenazi 2004).

TNF-alfa está envolvido na indução do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) em várias células e esse fator está relacionado ao crescimento e progressão tumoral em diversos tipos de cânceres. Por ser um fator de crescimento sua função é regular a maturação e diferenciação de células hematopoiéticas(Thomas et al. 2019), portanto, sua superexpressão pode envolver a migração de células indiferenciados para os sítios de inflamação e assim favorecer a sobrevivência das células nesse local(Wicks and Roberts 2016). O mecanismo pelo qual o TNF- α induz a produção de GM-CSF ainda não foi elucidado, porém um estudo recente mostrou que o TNF- α atua nas respostas inflamatórias através da acil-CoA sintetase 1 (ACSL1) e estudando essa via, foi observado que o bloqueio de ACSL1 diminuiu a liberação de GM-CSF nas células de tumor triplo negativo (Thomas et al. 2019).

Devido ao seu papel dicotômico na progressão tumoral, o TNF-alfa tem sua função estudada para que seja elucidado quando ocorrerá cada situação. Na situação de inibição tumoral, ele promove a necrose de tumores de xenoenxerto em camundongos quando em sinergia com IFN- γ em alguns casos e também teve o mesmo efeito quando administrado junto com outras drogas (Brouckaer et al. 1986). Com isso é visto que a sinergia da citocina com outras drogas se baseia no fato de o TNF aumentar a concentração da droga no local do tumor e com isso concluir que além de um papel citotóxico ele também pode mudar o microambiente tumoral (Ham et al. 2016).

Quanto ao seu papel de promover a progressão tumoral, é relatado que ele atua no início da progressão e esse fato foi constatado quando realizado um experimento em animais que

quando estimulados com a citocina foi observado um desenvolvimento do tumor. Ele pode atuar de várias maneiras a fim de contribuir com essa progressão, sendo algumas delas, ativação de NF- κ B que pode promover a sobrevivência das células, recrutando células imunossupressoras que podem iniciar tumores(MDSCs), dentre outros mecanismos (Ham et al. 2016).

A interleucina 6 ou IL-6 é uma citocina pró-inflamatória e assim como na inflamação ela tem um papel importante na imunidade e na produção dos elementos figurados do sangue. Macrófagos, células T, células endoteliais, células mesenquimais são alguns exemplos de células que atuam na produção de IL-6 (Akira et al. 1993). Quando ocorre um sinal de inflamação em um determinado local, a IL-6 é produzida nesse local e depois vai até o fígado e estimula a secreção de proteínas da inflamação sinalizadas pela IL-6 (Tanaka et al. 2014).

Devido ao seu papel na hematopoiese, na medula óssea ela estimula a maturação dos megacariócitos que consequentemente iniciarão a produção de plaquetas (Ishibashi et al. 1989). A IL-6 também atua na produção de anticorpos e nas células T efectoras, portanto, tem seu papel destacado na imunidade humoral. Porém, essa interleucina tem uma função pleiotrópica e por isso não atua somente nas células imunes, dessa forma, se houver uma desregulação na sua produção pode acarretar em algumas doenças (Kimura and Kishimoto 2010).

Apesar de sua atividade pró-inflamatória e importante função na manutenção da homeostase do organismo, a IL-6 também mostra um papel pró-tumoral através da sinalização celular para produção de estrógeno, migração celular e diminuição da apoptose, facilitando a progressão tumoral (Singh et al. 1997). O aumento de IL-6 circulante se mostrou com um pior prognóstico para pacientes pré-tratadas com a citocina no trabalho de (Salgado et al. 2003), porém, (Karczewska et al. 2000) mostrou que o aumento do mRNA de IL-6 e IL-6R são fatores de melhor prognóstico.

A IL-6 é relatada associada a tumores em estágios bem avançados, mostrando que seus altos níveis de concentração no soro estão relacionados a metástase. O TNF-alfa também é associado com casos mais avançados em diversos tumores, também é visto na iniciação da progressão tumoral, porém se mostra em níveis muito baixos em pacientes com câncer e grau extremo de enfraquecimento (Bossola et al. 2000). Isso mostra que essas citocinas, além de seus papéis principais, talvez tenham um papel coadjuvante no tumor. No câncer de próstata as duas citocinas se correlacionam, nos níveis elevados, com a metástase (Michalaki et al. 2004).

O kit LEGENDplex da BioLegend se baseia nos mesmos conceitos do ELISA sanduíche, onde o analito em questão é ligado por dois anticorpos, nesse caso, o TNF- alfa. Porém nesse ensaio, são utilizadas esferas (beads) que contém um anticorpo específico em cada uma na sua superfície que se ligarão nas citocinas e tudo isso ocorre ao mesmo tempo. A esfera

B3 contém o anticorpo específico para o TNF- α e quando forem colocados juntos irá ocorrer a ligação. Um anticorpo de detecção é colocado para se ligar ao TNF- α formando a ligação em “sanduíche” e depois é adicionado a estreptavidina que se ligará nesse anticorpo biotinilado. A análise é feita utilizando o citômetro de fluxo que irá detectar cada esfera que estiver ligada ao analito e ao sinal fluorescente, então isso é quantificado em fluorescência (BioLegend®).

Com isso, estabelecer uma relação entre as citocinas e alguns fatores clínicos pode fornecer informações relevantes para observar o papel dessas citocinas no ambiente tumoral.

Esse trabalho foi realizado para determinar a quantidade de TNF-alfa e IL-6 em pacientes com câncer de mama com estadiamentos e subtipos moleculares diferentes, com o propósito de estabelecer uma relação entre esses dados e mostrar o papel das citocinas no tumor de mama.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a concentração de TNF-alfa e IL-6 presente no soro de pacientes com câncer de mama em diferentes estadiamentos.

2.2 Objetivos Específicos

- Correlacionar o subtipo molecular com as concentrações das citocinas
- Correlacionar estadiamento tumoral com a concentração das citocinas estudadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, **CAAE**: 38930314.5.0000.5565 e **parecer** 1.230.380/2015. Cada paciente assinou os termos de consentimento livre e esclarecido (anexos a, b e c) aceitando a doação de sua amostra para os devidos fins. O soro foi colhido do sangue de 80 pacientes do Hospital de Câncer de Uberlândia antes de qualquer tratamento, inclusive cirurgia. Depois disso, foi obtido o soro de cada amostra e armazenado a -80°C no ultra freezer. No dia do experimento elas foram mantidas em temperatura ambiente para descongelarem, colocadas no vórtex por 30 segundos e centrifugadas durante 1 minuto apenas remover algumas partículas. Todas as amostras foram diluídas 2 vezes com um tampão de ensaio, conforme o protocolo do kit.

3.2 Kit LEGENDplex

Foi adquirido pela BioLegend, refrigerado entre 2° e 8°C e mantido fora da luz até sua utilização. Todos os procedimentos foram feitos seguindo as instruções da BioLegend.

Primeiramente foi preparado o tampão de lavagem, diluindo 25 ml do mesmo em 500 ml de água deionizada. A matriz B foi preparada em seguida, sendo que ela é liofilizada, então foi adicionado 5 ml de tampão para sua reconstituição.

Os reagentes presentes no kit foram produzidos para testar três citocinas, IL-6, IL-10 e TNF-alfa, ou seja, três esferas com o anticorpo específico de cada. Antes da diluição, cada frasco com as esferas foi colocado no vórtex por 1 minuto para homogeneizar. Cada esfera foi diluída 13 vezes, então 200 μl de cada uma foi diluído em 2000 μl de tampão de ensaio.

O padrão foi o próximo a ser preparado, nele foi colocado 250 μl do tampão de ensaio para reconstituir, pois ele é liofilizado. Dessa solução formada, foi transferido para um tubo eppendorf 100 μl e o mesmo foi identificado como C7, que está com a concentração máxima do padrão. A partir daí, sete tubos foram identificados de C6 a C0, adicionados 75 μl de tampão de ensaio em cada um deles para ser realizada uma diluição seriada de 1:4. Então, 25 μl de C7 foi adicionado em C6, 25 μl de C6 para C5, 25 μl de C5 para C4, 25 μl de C4

para C3, 25µl de C3 para C2, 25µl de C2 para C1 e 25µl de C1 foram descartados, pois C0 é a quantidade mínima do padrão, portanto, nele contém apenas o tampão de ensaio.

3.3 Delineamento Experimental

Foi utilizado uma placa de 96 poços com fundo em “V”, sendo que os padrões foram feitos em duplicata ocupando 16 poços e as amostras foram feitas unicamente ocupando 80 poços. Nos 16 poços do padrão, foi adicionado 25µl do padrão e 25µl de matriz B, já no poço das amostras foi colocado 25µl de tampão de ensaio e 25µl de amostra em seus respectivos poços.

A solução das esferas foi colocada no vórtex por 30 segundos e depois adicionada 25µl em todos os poços da placa. Após isso, a placa foi selada, envolta com papel alumínio para se abrigar da luz e colocada no agitador por 2 horas a 800 rpm. Terminada a agitação, a placa foi centrifugada a 250G por 5 minutos e o sobrenadante descartado.

Utilizando o tampão de lavagem, foi adicionado 200µl em todos os poços e centrifugado novamente por 5 minutos e depois descartado o sobrenadante. As lavagens são necessárias para descartar todas as partículas que não foram ligadas. Após a primeira lavagem, foi colocado 25µl do anticorpo de detecção em cada poço e a placa foi incubada novamente no agitador por 1 hora a 800 rpm. Posteriormente, foi adicionado 25µl de SA-PE (estreptavidina-ficoeritrina) que se ligará ao anticorpo de detecção biotinilado, e então a placa foi incubada por mais 30 minutos no agitador e depois 5 minutos na centrífuga. O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet foi ressuspensionado com 150µl de tampão de lavagem em todos os poços. Por fim, a ressuspensão foi transferido para um tubo eppendorf e colocado no citômetro de fluxo para a leitura.

3.4 Processamento das amostras

As amostras foram processadas no citômetro CytoFLEX da Beckman Coulter e o software utilizado foi o CytExpert. O citômetro foi configurado seguindo as orientações da BioLegend e a análise foi feita a partir dos dados APC e PE dos analitos, sendo APC usado para identificar qual esfera está presente e ligada ao analito e PE a quantidade desse analito. Foram

capturados cerca de 980 eventos e depois que todas amostras foram lidas, os dados foram exportados para o Software LegendPlex™ Data Analysis, fornecido pelo fabricante.

3.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos no citômetro de fluxo foram analisados foram exportados em arquivos.fcs para o software de análise do LEGENDplex™. A curva padrão foi determinada e os valores em pg/mL foram obtidos a partir da intensidade média de fluorescência de cada analito. Esses valores foram estruturados no software SPSS versão 25 para Windows. Os dados que ficaram abaixo do ponto mínimo da curva padrão foram desconsiderados, uma vez que não possível determinar o valor exato da concentração de citocina presente na amostra. Utilizou-se o teste de Kolgomorov-Smirnov para análise da igualdade da distribuição das amostras com a curva de Gauss. Empregou-se o teste de Levene para analisar a variância entre grupos. Para comparação de dois grupos, utilizou-se o Teste T de Amostras Independentes. Para comparação de mais de dois grupos, utilizou-se o Teste F de Anova, aplicando-se a correção de Welch caso a variância entre grupos fosse diferente. Para analisar a correlação entre os grupos foi feito o teste de correlação de Pearson. Todos os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Receptores Hormonais

Os resultados obtidos mostraram que a presença ou ausência dos receptores ER, PG e HER2 não influencia na produção de IL-6 pelo paciente com câncer de mama. (Tabela 1).

TABELA 1 – Relação entre a presença dos receptores hormonais e a IL-6

	N(média)	Porcentagem	DP	p
ER +	48(11,41)	68,8	2,31	0,461
ER -	14(9,17)	25	1,91	
PG +	40(12,13)	58,8	2,73	0,269
PG-	22(8,66)	35	1,48	
HER2 +	12(12,05)	16,3	3,35	0,764
HER2 -	50(10,63)	77,5	2,15	

Nota: ER: receptor de estrógeno; PG: receptor de progesterona; HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico; N: número de amostras; média: representada em pg/ml; DP: desvio padrão; p: probabilidade de significância para cada grupo de receptores;

A detecção do TNF nos pacientes com câncer de mama foi baixa. Muito dos pacientes produziram TNF com valores inferiores ao ponto mais baixo da curva padrão. Portanto, esses pacientes não foram considerados. Neste sentido, a comparação das médias entre os grupos ER e PG não foi possível. No entanto, apesar do N discrepante entre os grupos, foi possível definir que não há diferença na produção de TNF entre os grupos HER2 positivo e negativo (Tabela 2).

TABELA 2 – Relação entre a presença dos receptores hormonais e o TNF- α

	N(média)	Porcentagem	DP	p
ER+	8(4,77)	68,8	1,15	-
ER-	1(11,39)	25	-	-
PG+	8(4,77)	58,8	1,15	-
PG-	1(11,39)	35	-	-
HER2+	2(7,64)	16,3	4,53	0,4
HER2-	7(4,90)	77,5	1,2	

Nota: ER: receptor de estrógeno; PG: receptor de progesterona; HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico; N: número de amostras; média: representada em pg/ml; DP: desvio padrão; p: probabilidade de significância; -: não foi possível calcular o valor;

4.2 Estadiamento e Metástase

A análise de correlação não apontou uma relação entre estadiamento e metástase com IL-6 e TNF (Tabela 3,4).

TABELA 3 – Relação entre IL-6, Estadiamento e Metástase

	Classificação	N(média)	Porcentagem	DP	p
ESTADIAMENTO	Inicial	40(8,66)	63,7	1,37	0,191
	Avançado	22(14,98)	30	4,49	
METÁSTASE	Presente	26(14,72)	33,8	3,96	0,082
	Ausente	27(7,25)	46,3	1,22	

Nota: N: número de amostras; média: representada em pg/ml; DP: desvio padrão; p: probabilidade de significância;

TABELA 4 – Relação entre Estadiamento, Metástase e TNF- α

	Classificação	N(média)	Porcentagem	DP	p
ESTADIAMENTO	Inicial	5(5,75)	63,7	1,74	0,191
	Avançado	4(5,20)	30	2,07	
METÁSTASE	Presente	7(6,28)	33,8	1,5	-
	Ausente	0(-)	46,3	-	-

Nota: N: número de amostras; média: representada em pg/ml; DP: desvio padrão; p: probabilidade de significância; -: não foi possível calcular o valor;

4.3 Grau e Subtipo

Quanto ao grau e subtipo tumoral, também não houve relação entre a presença da IL-6 e TNF- α e entre qualquer grau ou subtipo do câncer, ou seja, o subtipo e grau não influencia na não tem correlação com a produção das citocinas. O oposto também é verdadeiro (Tabela 5 e 6).

TABELA 5 – Relação entre Subtipo, Grau e IL-6

	Classificação	N(média)	Porcentagem	DP	p
SUBTIPO	Luminal A	19(9,11)	27,5	12,03	0,835
	Luminal B	21(12,53)	31,3	20,05	
	Her2	12(12,53)	16,3	11,46	
	Triplo-negativo	10(8,92)	18,8	7,91	
GRAU	G1	10(8,65)		9,74	0,815
	G2	33(11,95)	-	17,92	
	G3	18(10,44)		9,71	

Nota: N: número de amostras; média: representada em pg/ml; DP: desvio padrão; p: probabilidade de significância; G1: grau 1; G2: grau 2; G3: grau 3;

TABELA 6 – Relação entre Subtipo, Grau e TNF- α

	Classificação	N(média)	Porcentagem	DP	p
SUBTIPO	Luminal A	3(4,29)	27,5	2,17	-
	Luminal B	3(3,34)	31,3	0,73	
	Her2	2(7,64)	16,3	6,41	
	Triplo-negativo	1(11,39)	18,8	-	
GRAU	G1	0		-	0,125
	G2	6(6,59)	-	4,28	
	G3	3(3,34)		0,73	

Nota: N: número de amostras; média: representada em pg/ml; DP: desvio padrão; p: probabilidade de significância; G1: grau 1; G2: grau 2; G3: grau 3; -: não foi possível calcular o valor;

4.4 Correlação entre Receptores hormonais e estadiamento

Nesse teste, foi feita uma correlação entre os receptores de estrógeno, progesterona e HER2, tanto positivo quanto negativo, com o estadiamento inicial e avançado. O resultado mostra que não houve correlação entre os dados analisados (Tabela 7).

Tabela 7 – Correlação entre Receptores Hormonais e Estadiamento

		ER		PG		HER2	
ESTADIAMENTO		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
	Inicial	37	14	33	18	7	44
	Avançado	18	6	14	10	6	18
	p	0,823		0,595		0,229	

Nota: ER: receptor de estrógeno; PG: receptor de progesterona; HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico; p: probabilidade de significância

4.5 Correlações entre IL-6, TNF- α e variáveis clínicas

Em todas as correlações analisadas não houve resultado significativo, mostrando que a presença de IL-6 ou TNF- α não está correlacionada com as variáveis clínicas analisadas e vice-versa (Tabela 8).

Tabela 8 – Correlação entre IL-6, TNF- α e variáveis clínicas

Variáveis Clínicas	IL-6		TNF- α	
	N	p	N	p
ER	62	0,617	9	0,617
PG	62	0,372	9	0,96
HER2	62	0,764	9	0,4
SUBTIPO	62	0,909	9	0,76
ESTADIAMENTO	62	0,101	9	0,842
METÁSTASE	62	0,214	9	0,274

Nota: ER: receptor de estrógeno; PG: receptor de progesterona; HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico; p: probabilidade de significância; N: número de amostras;

5. DISCUSSÃO

Os dados desse estudo mostram que tanto TNF- α quanto a IL-6 não tiveram diferença na concentração em diferentes tipos de tumor, de graus diferentes ou subtipo de tumor de mama, porém o TNF- α carrega em seu próprio nome a função de promover a necrose em células tumorais desde que seja regulado corretamente. Nosso estudo mostrou que a concentração de TNF- α presente no soro desses 80 pacientes não tem relação com a metástase, contudo um outro trabalho concluiu que essa citocina pode estar ligada a metástase no câncer de mama (Bozcuk et al. 2004). Essa divergência pode ser explicada pelo fato de que nesse estudo os pacientes foram tratados com quimioterapia, já em nosso trabalho, o soro dos pacientes foi colhido antes de quaisquer intervenções. Outro artigo mostra que o TNF- α pode regular negativamente o receptor de estrógeno alfa e assim regular parcialmente as células tumorais MCF-7 (Lee and Nam 2008), mas os nossos resultados não mostram que a citocina está relacionada com o status do receptor. Isso pode ocorrer devido ao fato de que esse experimento de Lee and Nam foi feito *in vitro* em células da linhagem MCF-7, diferentemente de nosso que utilizou soro de pacientes. A relação entre o receptor de progesterona e o TNF é pouco estudada, mas alguns estudos apresentam uma correlação significativa entre o receptor de progesterona

superexpresso e a expressão de TNF- α em fragmentos de tecido, mostrando que essa relação está ligada com invasão e metástase das células, o que reforça a ideia de que a citocina possa estar ligada a migração celular, o que contrapõe os dados obtidos no nosso estudo (Zhou et al. 2014). Porém, deve-se levar em conta que o material analisado é diferente, pois esse artigo utilizou fragmentos de tecido do tumor de mama para realizar as análises onde é possível detectar níveis maiores de TNF- α .

Em relação ao HER2, não houve uma relação significativa entre a presença de TNF- α e o fato de o tumor ser positivo ou negativo para HER2, porém sabe-se que o TNF pode induzir expressão de HER2 produzindo fatores anti-apoptóticos, mostrando que a citocina possivelmente está ligada indiretamente a expressão de HER2 nas células MCF-7 (Li et al. 2012). Isso pode estar ligado ao fato de ter sido usado uma linhagem celular *in vitro*, além de ser um modelo diferente, nas amostras do nosso estudo foi detectado uma quantidade baixa de TNF acima do valor mínimo da curva padrão do kit.

Mesmo tendo sua função antitumoral, o TNF- α também se mostra pró-tumoral em alguns casos do tumor de mama em que há metástase, promovendo a sobrevivência das células e o acúmulo de células indiferenciadas no local, já que uma de suas funções é na hematopoiese. No nosso estudo não foi observado a relação da citocina com o nível do grau tumoral, mas um artigo que fez a análise de uma via de sinalização mostrou que a ativação da via MAPK/ERK por TNF- α pode induzir a migração celular, que está presente nos tipos de tumores com graus mais elevados (Wolczyk et al. 2016). Nesse estudo, o autor não se utilizou de dosagens da citocina em soro, mas apenas analisou a sua função e relação com a metástase, portanto, as concentrações baixas obtidas em nossos resultados podem ser a causa dessa divergência de resultados.

Quanto ao subtipo molecular, também não houve uma relação estatística com a citocina, mas sabe-se que nos subtipos luminal e HER2 positivo há a presença de altos níveis de TNF- α e no subtipo triplo-negativo teve o perfil mais agressivo, havendo uma redução desses níveis, contrapondo outros dados que mostram a citocina envolvida na metástase que é característico de estágios avançados como em subtipos triplo-negativo (Herrera et al. 2012). O artigo em questão fez a dosagem da citocina utilizando um kit de ELISA que é mais sensível que o LegendPlex utilizado em nosso experimento e isso pode ser o motivo de os dados não corroborarem.

Com base nos resultados obtidos com a análise da interleucina-6, observamos que não houve nenhuma relação entre a presença da citocina, concentração e os fatores analisados. É relatado na literatura que a IL-6 pode assumir tanto um papel pró-tumoral com um pior prognóstico e também pode ser um fator de melhor prognóstico quando há um aumento de mRNA da citocina e de seu receptor (IL-6R) (Karczewska et al. 2000, Salgado et al. 2003). A divergência nesse caso pode ser pelo fato de que foi feita uma alteração no mRNA para que fosse observado seus efeitos e não analisado o efeito em níveis normais para o tumor. Em outro trabalho é observado que há uma diminuição induzida de IL-6 apenas nos tumores negativos para o receptor de estrógeno, nos outros subtipos a concentração não foi alterada, mostrando que possivelmente há uma relação entre a presença do receptor e a citocina (Jiang et al. 2000). A concentração da IL-6 em mulheres normais varia de 0,7 a 2,5pg/ml e em pacientes com câncer de mama varia de 38,3 a 138,7pg/ml (Jiang et al. 2000). O que não foi observado com significância em nosso estudo, possivelmente pelo fato da sensibilidade do LegendPlex. Sabe-se que os altos níveis de IL-6 estão correlacionados com a metástase linfonodal, portanto, com tumores em graus elevados, e a expressão do receptor de estrógeno e HER2, acentuando a hipótese de sua atividade pró-tumoral relacionada com a presença de receptores (Ma et al. 2017). Esse trabalho utilizou indivíduos com carcinoma ductal e indivíduos saudáveis, além do ELISA para dosagem das citocinas e isso pode interferir na divergência de nossos resultados.

Em tumores triplo-negativo que são caracterizados por sua agressividade e potencial metastático, não foram constatadas associações entre a IL-6 e esse subtipo, mas na literatura é visto que a inibição de IL-6 reduz a agressividade do tumor, reforçando a relação entre sua presença e a malignidade do câncer (Liu et al. 2019). Pela análise do tecido e outra por soro pode haver diferenças nas quantificações e também pelo fato de que nesse trabalho foi utilizado tecido de camundongo e ensaios *in vitro*.

Em todas as correlações feitas não foi observado resultado significativo, então, nessas 80 amostras analisadas, não há correlação entre estadiamento tumoral e receptores hormonais e nem IL-6 ou TNF- α com receptores hormonais, subtipo molecular, estadiamento e metástase. Mesmo considerando que o kit LegendPlex se baseie em uma técnica avançada para detecção de citocinas em soro, sua sensibilidade é menor do que o método de ELISA e essa diferença de sensibilidade pode ter sido a causa da não correlação dos dados devido a baixa detecção de citocinas. Porém, ainda assim, é uma técnica avançada que tem sua importância destacada na detecção de vários analitos ao mesmo tempo.

6. CONCLUSÃO

Não há correlação entre os níveis de IL-6 e TNF-alfa e as variáveis clínicas nas amostras desses 80 pacientes com câncer de mama sem tratamento, porém o estudo e análise dessas citocinas no câncer de mama tem muita importância, pois são analitos que tem sua função estritamente ligada ao desenvolvimento e progressão da doença e tendo seus mecanismos, no câncer de mama, elucidados podem se tornar bons biomarcadores desse tipo de tumor.

7. REFERÊNCIAS

Akira, S., T. Taga and T. Kishimoto (1993). "Interleukin-6 in biology and medicine." Adv Immunol **54**: 1-78.

Andreopoulou, E., S. J. Schweber, J. A. Sparano and H. M. McDaid (2015). "Therapies for triple negative breast cancer." Expert Opin Pharmacother **16**(7): 983-998.

Bai, X., E. Zhang, H. Ye, V. Nandakumar, Z. Wang, L. Chen, C. Tang, J. Li, H. Li, W. Zhang, W. Han, F. Lou, D. Zhang, H. Sun, H. Dong, G. Zhang, Z. Liu, Z. Dong, B. Guo, H. Yan, C. Yan, L. Wang, Z. Su, Y. Li, L. Jones, X. F. Huang, S. Y. Chen and J. Gao (2014). "PIK3CA and TP53 gene mutations in human breast cancer tumors frequently detected by ion torrent DNA sequencing." PLoS One **9**(6): e99306.

Balkwill, F. (2009). "Tumour necrosis factor and cancer." Nat Rev Cancer **9**(5): 361-371.

Bauer, K. R., M. Brown, R. D. Cress, C. A. Parise and V. Caggiano (2007). "Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry." Cancer **109**(9): 1721-1728.

Bossola, M., M. Muscaritoli, R. Bellantone, F. Pacelli, A. Cascino, A. Sgadari, F. Battaglia, E. Piccioni, G. Scambia, G. B. Doglietto and F. Rossi Fanelli (2000). "Serum tumour necrosis factor-alpha levels in cancer patients are discontinuous and correlate with weight loss." Eur J Clin Invest **30**(12): 1107-1112.

Bozcuk, H., G. Uslu, M. Samur, M. Yildiz, T. Ozben, M. Ozdogan, M. Artac, H. Altunbas, I. Akan and B. Savas (2004). "Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fasting serum insulin correlate with clinical outcome in metastatic breast cancer patients treated with chemotherapy." Cytokine **27**(2-3): 58-65.

Brouckaert, P. G., G. G. Leroux-Roels, Y. Guisez, J. Tavernier and W. Fiers (1986). "In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN-gamma, on a syngeneic murine melanoma." Int J Cancer **38**(5): 763-769.

Carey, L. A., C. M. Perou, C. A. Livasy, L. G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M. A. Troester, C. K. Tse, S. Edmiston, S. L. Deming, J. Geradts, M. C. Cheang, T. O. Nielsen, P. G. Moorman, H. S. Earp and R. C. Millikan (2006). "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study." JAMA **295**(21): 2492-2502.

Coleman, R. E. and R. D. Rubens (1987). "The clinical course of bone metastases from breast cancer." Br J Cancer **55**(1): 61-66.

Dawood, S., K. Broglio, J. Ensor, G. N. Hortobagyi and S. H. Giordano (2010). "Survival differences among women with de novo stage IV and relapsed breast cancer." Ann Oncol **21**(11): 2169-2174.

Foulkes, W. D., I. E. Smith and J. S. Reis-Filho (2010). "Triple-negative breast cancer." N Engl J Med **363**(20): 1938-1948.

Ham, B., M. C. Fernandez, Z. D'Costa and P. Brodt (2016). "The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis." Trends Cancer Res **11**(1): 1-27.

Herrera, A. C., C. Panis, V. J. Victorino, F. C. Campos, A. N. Colado-Simao, A. L. Cecchini and R. Cecchini (2012). "Molecular subtype is determinant on inflammatory status and immunological profile from invasive breast cancer patients." Cancer Immunol Immunother **61**(11): 2193-2201.

Idriss, H. T. and J. H. Naismith (2000). "TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)." Microsc Res Tech **50**(3): 184-195.

Ishibashi, T., H. Kimura, Y. Shikama, T. Uchida, S. Kariyone, T. Hirano, T. Kishimoto, F. Takatsuki and Y. Akiyama (1989). "Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice." Blood **74**(4): 1241-1244.

Iwao, K., Y. Miyoshi, C. Egawa, N. Ikeda and S. Noguchi (2000). "Quantitative analysis of estrogen receptor-beta mRNA and its variants in human breast cancers." Int J Cancer **88**(5): 733-736.

Jiang, X. P., D. C. Yang, R. L. Elliott and J. F. Head (2000). "Reduction in serum IL-6 after vaccination of breast cancer patients with tumour-associated antigens is related to estrogen receptor status." Cytokine **12**(5): 458-465.

Karczewska, A., S. Nawrocki, D. Breborowicz, V. Filas and A. Mackiewicz (2000). "Expression of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and glycoprotein 130 correlates with good prognoses for patients with breast carcinoma." Cancer **88**(9): 2061-2071.

Kimura, A. and T. Kishimoto (2010). "IL-6: regulator of Treg/Th17 balance." Eur J Immunol **40**(7): 1830-1835.

Kriegler, M., C. Perez, K. DeFay, I. Albert and S. D. Lu (1988). "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF." Cell **53**(1): 45-53.

Lee, S. H. and H. S. Nam (2008). "TNF alpha-induced down-regulation of estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells." Mol Cells **26**(3): 285-290.

Li, X., Y. Zhao, Y. Zhang, N. Du and H. Ren (2012). "Tumor necrosis factor alpha stimulates Her-2 cleavage by activated caspase-8." Cell Physiol Biochem **30**(4): 889-897.

Liu, J., L. Liu, E. Yague, Q. Yang, T. Pan, H. Zhao, Y. Hu and J. Zhang (2019). "GGNBP2 suppresses triple-negative breast cancer aggressiveness through inhibition of IL-6/STAT3 signaling activation." Breast Cancer Res Treat **174**(1): 65-78.

Ma, Y., Y. Ren, Z. J. Dai, C. J. Wu, Y. H. Ji and J. Xu (2017). "IL-6, IL-8 and TNF-alpha levels correlate with disease stage in breast cancer patients." Adv Clin Exp Med **26**(3): 421-426.

Michalaki, V., K. Syrigos, P. Charles and J. Waxman (2004). "Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer." Br J Cancer **90**(12): 2312-2316.

Salgado, R., S. Junius, I. Benoy, P. Van Dam, P. Vermeulen, E. Van Marck, P. Huget and L. Y. Dirix (2003). "Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer." Int J Cancer **103**(5): 642-646.

Singh, A., A. Purohit, L. J. Duncan, K. Mokbel, M. W. Ghilchik and M. J. Reed (1997). "Control of aromatase activity in breast tumours: the role of the immune system." J Steroid Biochem Mol Biol **61**(3-6): 185-192.

Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J. C. Matese, P. O. Brown, D. Botstein, P. E. Lonning and A. L. Borresen-Dale (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10869-10874.

Steeg, P. S. (2016). "Targeting metastasis." Nat Rev Cancer **16**(4): 201-218.

Taherian-Fard, A., S. Srihari and M. A. Ragan (2015). "Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis." Brief Bioinform **16**(3): 461-474.

Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2014). "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(10): a016295.

Thomas, R., F. Al-Rashed, N. Akhter, F. Al-Mulla and R. Ahmad (2019). "ACSL1 Regulates TNFalpha-Induced GM-CSF Production by Breast Cancer MDA-MB-231 Cells." Biomolecules **9**(10).

Varfolomeev, E. E. and A. Ashkenazi (2004). "Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?" Cell **116**(4): 491-497.

Wicks, I. P. and A. W. Roberts (2016). "Targeting GM-CSF in inflammatory diseases." Nat Rev Rheumatol **12**(1): 37-48.

Wolczyk, D., M. Zaremba-Czogalla, A. Hryniewicz-Jankowska, R. Tabola, K. Grabowski, A. F. Sikorski and K. Augoff (2016). "TNF-alpha promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts." Cell Oncol (Dordr) **39**(4): 353-363.

Zheng, N., L. Liu, W. Liu, P. Zhang, H. Huang, L. Zang, T. Hayashi, S. Tashiro, S. Onodera, M. Xia and T. Ikejima (2016). "ERbeta up-regulation was involved in silibinin-induced growth inhibition of human breast cancer MCF-7 cells." Arch Biochem Biophys **591**: 141-149.

Zhou, X. L., W. Fan, G. Yang and M. X. Yu (2014). "The clinical significance of PR, ER, NF-kappa B, and TNF- alpha in breast cancer." Dis Markers **2014**: 494581.

ANEXOS

ANEXO A: Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada **“Uso dos indicadores de risco e protocolo para diagnóstico precoce dos cânceres de pulmão e mama entre parentes de primeiro e segundo grau de portadores destas neoplasias”**, sob a responsabilidade dos pesquisadores Rogério Agenor Araújo, Artur Aquino Santos, Eduarda da Costa Marinho, Grasielle de Sousa Igídio, Marielly Cunha Castro, Thais Rezende Mendes, Clarissa Lôbo Portugal da Cunha, Patrícia Ferreira Ribeiro, Rafael Mathias Antonioli e Marcelo José Barbosa Silva. Temos o objetivo de aprimorar a prevenção dos cânceres de mama e pulmão através do uso dos indicadores de risco e protocolo de diagnóstico clínico com realização de mamografia digital ou tomografia computadorizada, respectivamente, em parentes de primeiro e segundo grau de pacientes com esses tipos de cânceres.

Você irá responder a um questionário anônimo, individual, com perguntas fechadas, elaborado pelos pesquisadores. Caso seja identificado risco aumentado de desenvolvimento de câncer, será realizado exame de imagem para investigação diagnóstica. Você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa. Pacientes com carcinoma de mama ou pulmão terão coletados 8mL de sangue periférico antes, ao fim e após 6 meses do término do tratamento. Familiares classificados como “alto risco” para desenvolvimento dessas neoplasias terão apenas uma amostra de sangue (8mL) coletada, em data próxima à realização do exame de imagem. Em caso de confirmação do diagnóstico, o procedimento adotado será o mesmo para pacientes.

O estudo apresenta como prováveis riscos a perda de identidade, nervosismo, receio e desconforto durante aplicação do questionário e realização do exame. Pretende-se, no entanto, minimizar ao máximo tais riscos, explicando detalhadamente os objetivos da pesquisa, o modo de realização do exame e possibilitando aos indivíduos a livre opção de participar. Para minimizar o risco de perda de identidade, os pesquisadores se comprometem a manter sigilo absoluto, segundo a Resolução 466/12, e a utilizar código numérico para identificação da amostra. Pode haver leve hematoma ou desconforto no local da punção, portanto a coleta de sangue de pacientes será realizada em conjunto com os exames bioquímicos de rotina para minimizar esses riscos. O procedimento será realizado por profissional habilitado e capacitado. Os benefícios da pesquisa incluem um auxílio na

detecção precoce de câncer de pulmão e de mama em indivíduos com história familiar positiva.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou necessidade de se justificar. Em caso de dúvidas a respeito da realização da pesquisa, você poderá entrar em contato com: **Rogério Agenor Araújo** – 3291.6101 ou **Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos:** Av. Nicomedes Alves dos Santos, 4545. Gávea - Uberlândia/MG. CEP: 38411-106. Fone: 4009-9039. Email: cep@unitri.edu.br.

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

Rogério Agenor Araújo
Pesquisador principal

Uberlândia, _____ de _____ de 2016.

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido do participante da pesquisa

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “**Avaliação da imunocompetência local e sistêmica no prognóstico de pacientes com neoplasia de mama e estratégia de detecção precoce entre familiares de primeiro grau**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Rogério Agenor Araújo, Camila Piqui Nascimento, Eduarda da Costa

Marinho, Etelvina Rocha Tolentino Mosca, Felipe Andrés Cordero da Luz, Thais Rezende Mendes, Patrícia Ferreira Ribeiro, Rafael Mathias Antonioli e Marcelo José Barbosa Silva.

Nesta pesquisa temos o objetivo de aprimorar a prevenção do câncer de mama através do uso dos indicadores de risco e protocolo de diagnóstico clínico com realização de mamografia digital e/ou ultrassonografia das mamas em familiares de primeiro grau de pacientes com essa neoplasia. Ademais, pretende-se avaliar as características da resposta imunológica das pacientes com câncer de mama antes e após o tratamento oncológico e a interface com os marcadores de imunohistoquímica do tumor e da axila, além de associar a evolução das pacientes frente ao tratamento sistêmico com a resposta imunológica.

Você irá responder individualmente a um questionário semiestruturado, sobre fatores de risco para câncer de mama, elaborado pelos pesquisadores. Posteriormente, você indicará familiares de primeiro grau do sexo feminino que tenham interesse em participar da pesquisa e responder ao mesmo questionário. Caso seja identificado risco aumentado para seu familiar desenvolver o câncer de mama, ele será convidado a comparecer ao ambulatório de alto risco para investigação diagnóstica e acompanhamento. Para análise de marcadores sorológicos e avaliação de imunocompetência, serão coletados 12mL de sangue periférico antes, ao término e após 3 meses do seu tratamento. Para análise da imunocompetência local, após sua permissão, você assinará um Termo de Responsabilidade de Retirada de Amostra Biológica do Laboratório de Patologia em que o estudo anatomopatológico da sua biópsia foi realizado. Após conclusão das análises do bloco de parafina, o mesmo será arquivado no laboratório de origem. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa.

O estudo apresenta como prováveis riscos a perda de identidade, nervosismo, receio e desconforto durante aplicação do questionário e realização do exame. Pretende-se, no entanto, minimizar ao máximo tais riscos, explicando detalhadamente os objetivos da pesquisa, o modo de realização do exame e possibilitando aos indivíduos a livre opção de participar. Para minimizar o risco de perda de identidade, os pesquisadores se comprometem a manter sigilo absoluto, segundo a Resolução 466/12, e a utilizar código numérico para identificação da amostra e do questionário. Pode haver leve hematoma ou desconforto no local da punção, portanto a coleta de sangue de pacientes será realizada em conjunto com os exames bioquímicos de rotina para minimizar esses riscos. O procedimento será realizado por profissional habilitado e capacitado. Os benefícios da pesquisa incluem auxílio na detecção precoce de câncer de mama em indivíduos com história familiar positiva. Você é livre para deixar de participar da pesquisa

a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou necessidade de se justificar. Em caso de dúvidas a respeito da realização da pesquisa, você poderá entrar em contato com: **Rogério Agenor Araújo** – 3291.6166 ou **Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos**: Av. Nicomedes Alves dos Santos, 4545. Gávea - Uberlândia/MG. CEP: 38411-106. Fone: 4009-9039. Email: cep@unitri.edu.br.

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

Rogério Agenor Araújo
Pesquisador principal

Uberlândia, _____ de _____ de _____.

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido para pesquisa de biomarcadores

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada Investigação do perfil dos promotores relacionados ao câncer de mama como possíveis biomarcadores durante o estadiamento inicial, sob a responsabilidade do pesquisador Marcelo José Barbosa Silva. A razão da sua participação é que você é uma paciente com câncer de mama ou voluntária saudável (grupo controle). Nesta pesquisa nós estamos buscando entender quais são as substâncias em seu sangue que estão alteradas e que poderiam ser correlacionadas com o câncer de mama na fase inicial. Se você der o seu consentimento para participar deste estudo, um pouco do seu sangue (aproximadamente 2 mL) serão retirados através de uma punção da veia do seu

braço. Serão três momentos de coleta: após o laudo histopatológico, 1 e 6 meses após a biópsia. Todas as informações coletadas durante o estudo serão mantidas de forma confidencial, o que permitirá que a sua identidade não seja revelada. Os resultados serão analisados individualmente, e os mesmos serão mantidos com o grupo de pesquisa. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador Marcelo José Barbosa Silva ou por qualquer outro participante dessa pesquisa, antes da biópsia inicial no Hospital do Câncer – UFU. Os outros participantes são: Grasielle de Sousa Igídio, Letícia Reis de Oliveira Mamere, Livia Peres, Brunna Pultz, Rodolfo Gadia e Rogério Agenor de Araújo. Na sua participação, 2 mL de sangue serão removidos do seu braço por punção da veia. O sangue será estudado para a detecção de substâncias que possam estar alteradas em seu sangue e que possam indicar o desenvolvimento inicial do câncer de mama. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar da pesquisa. Os riscos consistem em formação de hematoma ou flebite no local que foi retirado o sangue. Embora as análises das amostras de sangue possam não beneficiá-lo diretamente, os resultados poderão futuramente ajudar outros pacientes com doenças similares à sua. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Dr. Marcelo José Barbosa Silva no bloco 4C, Laboratório de Imunologia, no campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia. Fone: 3218 – 2058. Também, o Dr. Rogério Agenor de Araújo nos seguintes telefones (34) 3291-6100 - (34) 2101-1929, no Hospital do Câncer, campus Umuarama. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131. Uberlândia, dede 20.....

_____ Assinatura dos pesquisadores
Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido. _____ Participante da pesquisa